

2/9/1

DIALOG(R)File 347:JAPIO

(c) 2001 JPO & JAPIO. All rts. reserv.

05363800 \*\*Image available\*\*

IMMOBILIZATION OF LECTIN AND BASE FOR CELL USING THE SAME

PUB. NO.: 08-319300 [JP 8319300 A]  
PUBLISHED: December 03, 1996 (19961203)  
INVENTOR(s): YURA HIROFUMI  
GOTO MITSUAKI  
AKAIKE TOSHIHIRO  
APPLICANT(s): KANAGAWA KAGAKU GIJUTSU AKAD [000000] (A Japanese Company or Corporation), JP (Japan)  
APPL. NO.: 08-059695 [JP 9659695]  
FILED: March 15, 1996 (19960315)  
INTL CLASS: [6] C07K-017/10; C07K-014/42; C12M-001/00; C12M-003/00; G01N-033/547; G01N-033/566  
JAPIO CLASS: 14.1 (ORGANIC CHEMISTRY -- Organic Compounds); 14.5 (ORGANIC CHEMISTRY -- Microorganism Industry); 28.2 (SANITATION -- Medical); 46.2 (INSTRUMENTATION -- Testing)

#### ABSTRACT

PURPOSE: To efficiently and stably immobilize a lectin useful as a material for a cell, etc., by adsorbing a saccharide chain polymer having a saccharide chain specifically bonding to a lectin to be immobilized to a base and bonding the lectin to the saccharide chain polymer.

CONSTITUTION: A saccharide chain polymer 2 comprising a poly(N-p-vinylbenzyl-(O-.beta.-D-galactopyranosyl(1->4)-D-gluconamide)) of the formula ((n) is a degree of polymerization) obtained by polymerizing a monomer prepared by reacting p-aminomethylstyrene with a lactonized substance of a saccharide such as lactose, etc., is used as a saccharide chain polymer containing a saccharide chain to be specifically bonded to a lectin to be immobilized. The saccharide chain polymer 2 is adsorbed on the surface of a base (e.g. a laboratory dish, etc.), a saccharide chain 21 bonded to a polymer main chain 22 is linked to a lectin 3 so that a cell 40 is bonded through the saccharide chain 21 on the surface of the cell membrane by the immobilized lectin to efficiently immobilize the lectin useful as a base for a cell efficiently exhibiting function such as culture, etc.

特開平8-319300

(43)公開日 平成8年(1996)12月3日

(51)Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 K 17/10		8517-4H	C 0 7 K 17/10	
14/42		8517-4H	14/42	
C 1 2 M 1/00			C 1 2 M 1/00	A
3/00			3/00	Z
// G 0 1 N 33/547			G 0 1 N 33/547	
審査請求 未請求 請求項の数4 O L (全 9 頁) 最終頁に続く				

(21)出願番号 特願平8-59695

(22)出願日 平成8年(1996)3月15日

(31)優先権主張番号 特願平7-59577

(32)優先日 平7(1995)3月17日

(33)優先権主張国 日本 (J P)

(71)出願人 591243103

財団法人神奈川県科学技術アカデミー

神奈川県川崎市高津区坂戸3丁目2番1号

(72)発明者 由良 洋文

神奈川県藤沢市湘南台5-9-1-601

(72)発明者 後藤 光昭

神奈川県川崎市中原区上小田中221 光ハイツB203

(72)発明者 赤池 敏宏

東京都保谷市下保谷4-15-23

(74)代理人 弁理士 志賀 正武 (外2名)

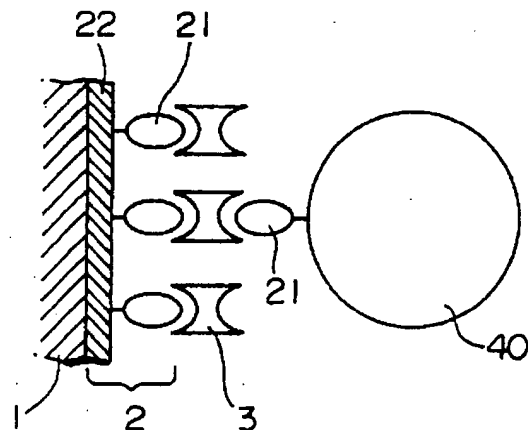
(54)【発明の名称】 レクチンの固定化法及びそれを用いた細胞用基材

(57)【要約】

【課題】 レクチンを効率よく安定かつ強固に固定化できる新規な固定化法を提供する。

【解決手段】 固定化すべきレクチン3と特異的に結合する糖鎖21を有する糖鎖高分子2を基材1に吸着させ、その糖鎖高分子2を介して該レクチン3を固定化することからなるレクチンの固定化法、及び、この固定化法によって表面にレクチンを固定化したシャーレ、ビーズなどの細胞用基材。

【効果】 吸着性の良好な糖鎖高分子を介し、その糖鎖にレクチンを結合させるため、極めて安定なおかつ強固にレクチンを固定化することができる。複数のレクチンを含む混合溶液からでも、目的とするレクチンを選択的に固定化できる。濃縮・固定化されたレクチンによって効果的に機能が発揮される細胞用基材を提供できる。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 固定化すべきレクチンと特異的に結合する糖鎖を有する糖鎖高分子を基材に吸着させ、その糖鎖高分子を介して該レクチンを固定化することからなるレクチンの固定化法。

【請求項2】 前記糖鎖高分子が、

ポリ(N-p-ビニルベンジル-[O-β-D-ガラクトピラノシル-(1→4)-D-グルコンアミド])、

ポリ(N-p-ビニルベンジル-[O-α-D-グルコピラノシル-(1→4)-D-グルコンアミド])、

ポリ(N-p-ビニルベンジル-[O-β-D-マンノピラノシル-(1→4)-D-マンナミド])、

ポリ(N-p-ビニルベンジル-[O-α-D-ガラクトピラノシル-(1→6)-D-グルコンアミド])、

ポリ(N-p-ビニルベンジル-[O-6-カルボキシメチル-β-D-ガラクトピラノシル-(1→4)-O-D-6-カルボキシメチル-グルコンアミド])、

ポリ(3-O-4'-ビニルベンジル-D-グルコース)、

ポリ(N-p-ビニルベンジル-[O-2-アセトアミド-2-デオキシ-β-D-グルコピラノシル-(1→4)-O-D-2-アセトアミド-2-デオキシ-β-D-グルコピラノシル-(1→4)-O-D-2-アセトアミド-2-デオキシ-β-D-グルコンアミド])及び/またはポリ(N-p-ビニルベンジル-[O-2-アセトアミド-2-デオキシ-β-D-グルコピラノシル-(1→4)-O-D-2-アセトアミド-2-デオキシ-β-D-グルコンアミド])、

ポリ(N-p-ビニルベンジル-D-グルコンアミド)、及び、

ポリ(N-p-ビニルベンジル-[O-β-D-グルコピラノシル-(1→3)-D-グルコンアミド])から選択される少なくとも1つであることを特徴とする請求項1記載の固定化法。

【請求項3】 請求項1または2の固定化法を用いて表面に糖鎖高分子を介してレクチンを固定化した細胞用基材。

【請求項4】 前記基材が、シャーレ、フラスコ、プレート、キュベット、フィルム、ファイバー、またはビーズから選択されることを特徴とする請求項3記載の細胞用基材。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、レクチンの固定化法、特にレクチンと糖鎖との特異的結合性を利用した固定化法、及びこの固定化法を用いてレクチンを固定化した細胞用基材に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 生体内には、酵素反応、抗原-抗体反応等の様々な特異的反応が存在し、精緻な生体系をかたちづいているが、今日それらの生体反応をモデルとするバイオミメティックなシステムの研究が種々の分野で盛

んに行われている。

【0003】 中でも、近年の糖鎖工学の進歩には目ざましいものがあり、例えば、糖鎖を有する生体高分子としては、細胞の安定化に寄与する植物細胞の細胞壁のプロテオグリカン、細胞の分化、増殖、接着、移動等に影響を与える糖脂質、及び細胞間相互作用や細胞認識に関与している糖タンパク質等が挙げられるが、これらの高分子の糖鎖が、互いに機能を代行、補助、増幅、調節、あるいは阻害しあいながら高度で精密な生体反応を制御する機構が次第に明らかにされつつある。

【0004】 その一例として、細胞表面の糖鎖や、糖鎖-レセプター間の相互作用異常による疾病の発生、あるいはエイズなどのウイルス感染における糖鎖の役割等に関する研究が活発化してきている。また、細胞-細胞間相互作用、細胞-マトリックス間相互作用における糖鎖の関与に関する研究も、生体反応を理解する上で重要になってきている。

【0005】 本発明者らは、従来から糖鎖の特異的な親和力に着目し鋭意研究を行ってきており、例えば、アシアロ糖タンパク質(ASGPと略記)レセプターに対するリガンドのモデルとして、ガラクトースを側鎖に有するポリマーであるポリ(N-p-ビニルベンジル-[O-β-ガラクトピラノシル-(1→4)-D-グルコンアミド]) (通称：ポリビニルベンジラクトンアミド、以後PV-LAと略記)を設計・合成した。

【0006】 上記のPV-LAを被覆したシャーレを用いることにより、PV-LAと肝実質細胞表面のアシアロ糖タンパク質レセプターとの特異的親和力を介して肝実質細胞が選択的に接着され、しかもその接着形態が特徴的であって三次元の自己集合体が導かれることを見いだした。これらの現象は、例えばコラーゲン、ファイブロネクチン等の従来の接着タンパク質を被覆したシャーレでは観察されないものである(由良洋文、赤池敏宏、「細胞培養」、第19巻、317-322頁、1993年)。

【0007】 一方、主に植物を起源とするレクチンは、多糖類や複合糖類を沈降させる等の糖鎖に対する特異的結合性を有することが知られており、不溶化レクチンを用いて複合糖類を分離する試みなどが行われている。しかしながら従来は、レクチンを固定化する際に、基材にレクチンを単純に吸着させるか、基材に共有結合させる等の方法が用いられていた。単に吸着させただけでは、レクチンを安定かつ強固に固定化することは困難であり、共有結合させる場合は、手間のかかる化学反応を経なければならなかった。そこで本発明者らは、上記の事情に鑑み、糖鎖高分子を用いてレクチンを安定かつ強固に固定化する方法を見だし本発明をなすに至った。

## 【0008】

【発明が解決しようとする課題】 よって、本発明の課題は、レクチンを効率よく安定に固定化または濃縮できる

新規な方法を提供し、加えてその固定化法を用いてレクチンを固定化した細胞用基材を提供することにある。

【0009】

【課題を解決するための手段】かかる課題は、固定化すべきレクチンと特異的に結合する糖鎖を有する糖鎖高分子を基材に吸着させ、その糖鎖高分子を介して該レクチンを固定化することからなるレクチンの固定化法によって解決できる。

【0010】

【発明の実施の形態】以下に、本発明のレクチン固定化法を図面を参照して詳細に説明する。図1に示すように、本発明の固定化法では、まず基材1表面に、糖鎖21が高分子主鎖22に結合されてなる糖鎖高分子2を吸着させる。ここで用いられる糖鎖高分子2は、合成高分子主鎖22とそれに結合された糖鎖21とから構成されている。次に、糖鎖高分子2の糖鎖21に固定化すべきレクチン3を特異的に結合させる。

【0011】本発明で使用される糖鎖高分子の主鎖は、側鎖として糖鎖を導入でき、通常の方法で重合可能なものならば特に限られないが、例えばポリスチレン、塩化ビニル、ポリエチレン、ポリエチレンテレフタレート、ポリプロピレン、またはそれらの誘導体等のビニル系の高分子を用いるのが好ましい。特に、シャーレ等の材料として広く使用されているポリスチレンまたはその誘導体からなる合成高分子を使用した場合には、そのシャーレ等の表面に対する吸着性が向上するので好ましい。

【0012】また、この糖鎖高分子をなす糖鎖としては、グルコース、ガラクトース、ラクトース、マンノース、N-アセチルグルコサミン、ラミナリビオース、ウロン酸関連物質、硫酸糖等の単糖類、オリゴ糖類等がいずれも使用でき、上記合成高分子に側鎖として結合した状態で、レクチンと特異的に結合する糖残基を保持できるものならば、特に限定されるものではない。

【0013】本発明で用いる糖鎖高分子2において、高分子主鎖22と糖鎖21との結合方法は、アミド結合、エーテル結合、エステル結合等の共有結合とするのが好ましい。例えば、p-アミノメチルスチレンのアミノ基と、ラクトン化した糖の末端カルボニル基間でアミド結合を形成するのが好ましい。また、この高分子主鎖と糖鎖とは、合成高分子をなすモノマーと糖鎖分子とを結合させてから重合してもよいし、結合可能な官能基を有するモノマーを重合した後に糖鎖を結合させてもよい。但し、1分子中に導入される糖鎖の数を制御できることから、糖鎖を結合させたモノマーを重合するのが好ましい。

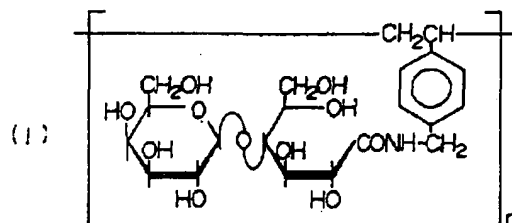
【0014】また、この糖鎖高分子は、レクチンを高濃度に固定化、濃縮する場合は、糖鎖を結合させたモノマーを単独重合させたホモポリマーとし、吸着する糖鎖密度を高くするのが好ましく、逆に、レクチンを疎に固定化したい場合は、他のモノマーと共重合体として糖鎖の

数を減らしてもよい。さらに、親水性等の他の性質を有する他のモノマーとの共重合体とすることにより、吸着した基材表面に親水性等の他の性質を付与するようにしてもよい。

【0015】本発明の固定化法にあつては、上記のような糖鎖高分子の中で、例えば、下記式(1)から(10)で表される糖鎖高分子が特に好適に用いられる。

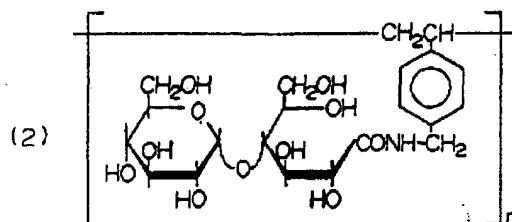
【0016】

【化1】



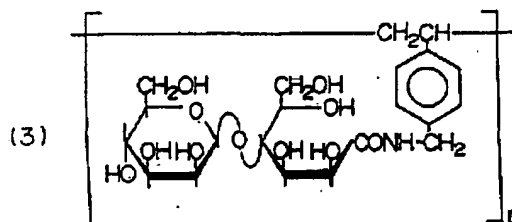
【0017】

【化2】



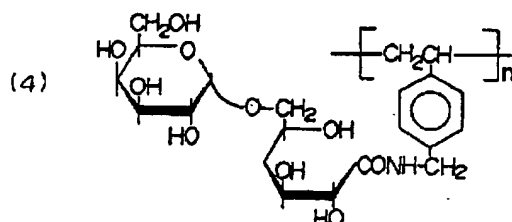
【0018】

【化3】



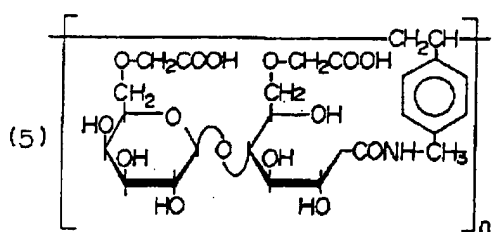
【0019】

【化4】



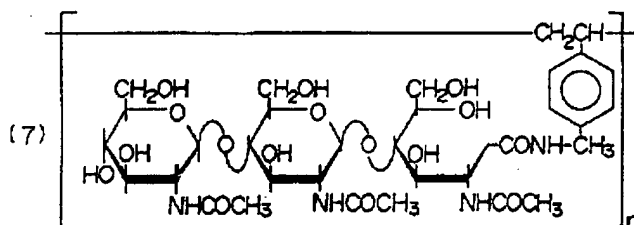
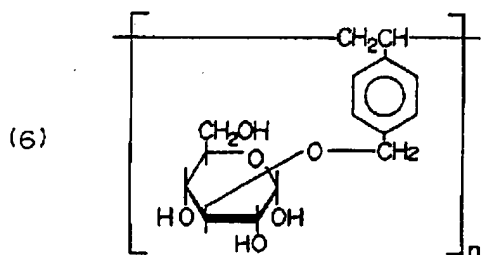
【0020】

【化5】



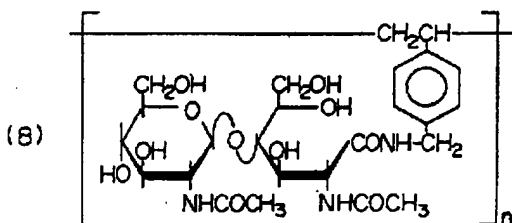
【0021】

【化6】



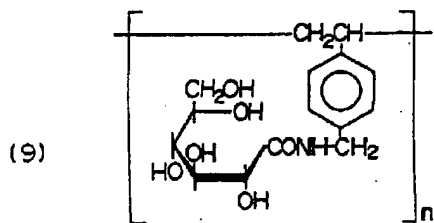
【0023】

【化8】



【0024】

【化9】

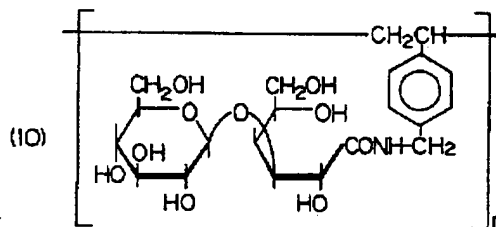


【0025】

【化10】

【0022】

【化7】



【0026】上記式(1)で表されるポリ(N-p-ビニルベンジル-[O-β-D-ガラクトピラノシル-(1→4)-D-グルコンアミド]) (以後、PV-LAと略記する)は、p-アミノメチルスチレンとラクトースとから合成されたモノマーを単独重合して得られるもので、β-ガラクトース残基を有する。

【0027】上記式(2)で表されるポリ(N-p-ビニルベンジル-[O-α-D-グルコピラノシル-(1→4)-D-グルコンアミド]) (以後、PV-MAと略記する)は、p-アミノメチルスチレンとマルトースとから合成されたモノマーを単独重合して得られるもので、グルコース残基を有する。

【0028】上記式(3)で表されるポリ(N-p-ビニルベンジル-[O-β-D-マンノピラノシル-(1→4)-D-マンナミド]) (以後、PV-Manと略記する)は、p-アミノメチルスチレンとマンノピオースとから合成されたモノマーを単独重合して得られるもので、マンノース残基を有する。

【0029】上記式(4)で表されるポリ(N-p-ビニルベンジル-[O-β-D-ガラクトピラノシル-(1→4)-D-グルコンアミド]) (以後、PV-LAと略記する)は、p-アミノメチルスチレンとラクトースとから合成されたモノマーを単独重合して得られるもので、β-ガラクトース残基を有する。

ルベンジル-[O- $\alpha$ -D-ガラクトピラノシル-(1 $\rightarrow$ 6)-D-グルコンアミド]) (以後、PV-MeAと略記する)は、p-アミノメチルスチレンとO- $\alpha$ -D-ガラクトピラノシル-(1 $\rightarrow$ 6)-D-グルコースとから合成されたモノマーを単独重合して得られるもので、 $\alpha$ -ガラクトース残基を有する。

【0030】上記式(5)で表されるポリ(N-p-ビニルベンジル-[O-6-カルボキシメチル- $\beta$ -D-ガラクトピラノシル-(1 $\rightarrow$ 4)-O-D-6-カルボキシメチル-グルコンアミド]) (以後、PV-LACOOHと略記する)は、p-アミノメチルスチレンとラクトースとから合成されたモノマーを単独重合して得られたPV-LAをカルボキシメチル化したもので、カルボキシメチル化- $\beta$ -ガラクトース残基を有する。

【0031】上記式(6)で表されるポリ(3-O-4'-ビニルベンジル-D-グルコース) (以後、PV-Gと略記する)は、p-クロロメチルスチレンとグルコースとから合成されたモノマーを単独重合して得られるもので、グルコース残基を有する。

【0032】上記式(7)で表されるポリ(N-p-ビニルベンジル-[O-2-アセトアミド-2-デオキシ- $\beta$ -D-グルコピラノシル-(1 $\rightarrow$ 4)-O-D-2-アセトアミド-2-デオキシ- $\beta$ -D-グルコピラノシル-(1 $\rightarrow$ 4)-O-D-2-アセトアミド-2-デオキシ- $\beta$ -D-グルコンアミド])、上記式(8)で表されるポリ(N-p-ビニルベンジル-[O-D-2-アセトアミド-2-デオキシ- $\beta$ -D-グルコピラノシル-(1 $\rightarrow$ 4)-O-D-2-アセトアミド-2-デオキシ- $\beta$ -D-グルコンアミド])、またはそれらの混合物(以後、いずれもPV-G1cNaと略記する)は、ともにN-アセチルグルコサミン残基を有する。

【0033】上記式(9)で表されるポリ(N-p-ビニルベンジル-D-グルコンアミド) (以後、PV-GAと略記する)は、D-グルコースを開環させてp-アミノメチルスチレンと結合させたモノマーを単独重合して得られるものである。

【0034】上記式(10)で表されるポリ(N-p-ビニルベンジル-[O- $\beta$ -D-グルコピラノシル-(1 $\rightarrow$ 3)-D-グルコンアミド]) (以後、PV-Lamと略記する)は、p-アミノメチルスチレンとラミナリビオースとから合成されたモノマーを単独重合して得られるもので、 $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3グルコース残基を有する。

【0035】本発明の固定化法では、これらの糖鎖高分子の中で、固定化したいレクチンと特異的結合する糖鎖を有する糖鎖高分子を選択して吸着させる。用いる糖鎖高分子は、1種のみでも2種以上を混合して用いてもよく、その使用目的に応じて適宜選択できる。

【0036】これらの糖鎖高分子を基材に吸着させるには、シャーレ等の基材1表面に糖鎖高分子溶液を適用し、溶媒を留去することにより容易に吸着させることが

できる。例えば、蒸留水を溶媒とする糖鎖高分子溶液を、ろ過、滅菌した後、シャーレ等に注入し、室温で2時間程度放置するだけでよい。吸着後、好ましくは、蒸留水で数回洗浄し、平衡塩溶液等で置換しておく。糖鎖高分子を溶解する溶媒としては水が好ましいが、用いる糖鎖高分子によっては、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、エタノール、メタノール等の有機溶媒やそれらと水との混合溶媒も使用できる。

【0037】上記の糖鎖高分子溶液の濃度は、固定化したいレクチンの密度に応じて適宜選択されるが、通常は、0.001から1.0mg/ml程度とされる。また、この糖鎖高分子溶液は、その濃度調整してもよいが、ストック溶液として保存しておいたものを使用すれば、さらに手間を省くことができる。その場合は、ストック溶液中の糖鎖高分子が会合している場合があるので、使用前に適度な超音波処理等を施すのが好ましい。

【0038】このようにして糖鎖高分子2を吸着させた基材1表面は、選択した糖鎖高分子2に固有の糖鎖21で修飾されている。次に、この糖鎖21で修飾された基材1にレクチン3を固定化する。これを行うには、レクチンの水溶液を糖鎖高分子吸着させた基材に適用し、溶媒を留去すればよい。

【0039】レクチン水溶液を糖鎖高分子修飾基材に適用すると、水溶液中のレクチン3が、基材1表面に吸着された糖鎖高分子2の糖鎖21に到達する。この糖鎖21は、該レクチンと特異的に結合するものが選択されているため、該レクチン3は、この糖鎖21と強固に結合して固定化される。

【0040】本発明で固定化されるレクチンは、何ら限定されるものではなく、各レクチンと特異的に結合する糖鎖を有する糖鎖高分子を介して良好に固定化される。例えば、ガラクトース残基を有するPV-LAを吸着させた基材には、ガラクトース結合性レクチンであるSBA、ECL、A110A、VAA等のレクチンを選択的に固定化することができ、グルコース残基を有するPV-MAを吸着させた基材には、GNL、LcH、PSA等のレクチンを、マンノース残基を有するPV-Manを吸着させた基材には、LCA、GNA、CPA等のレクチンを選択的に固定化できる。即ち、異なる種類のレクチンを含む溶液を適用したとしても、吸着させた糖鎖に特異的に結合するレクチンのみを選択的に固定化することも可能である。

【0041】本発明は、上記の固定化法で表面にレクチンを固定化した細胞用基材にも関する。レクチンを固定化する基材としては、シャーレ、フラスコ、プレート、キュベット、フィルム、ファイバー、またはビーズ等の従来から細胞培養に用いられている基材が好ましいが、それらに限られず、用途に応じていかなる形状の基材も使用できる。これらの基材は、ガラス、石英等の無機材料、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン等の

有機材料のいずれからなっているとしてもよいが、滅菌可能な程度の耐熱性及び耐水性を有している材料からなるのが好ましい。

【0042】特に合成高分子材料は、価格や成形性の点から好ましく、糖鎖高分子の吸着性から疎水性のものが好ましい。例えば、ポリスチレンやその誘導体を主鎖とする糖鎖高分子を用いる場合には、ポリスチレン及びその誘導体を主原料とする基材を使用するのが好ましい。

【0043】本発明の細胞用基材は、例えば図1に示すように、基材1表面に糖鎖高分子2が吸着され、その糖鎖高分子2の糖鎖21にレクチン3が固定化されている。従って、この細胞用基材表面は、固定化されたレクチンの種類によって異なる糖への特異的結合性を有している。例えば、ガラクトース残基を有する糖鎖高分子であるPV-LAを介してガラクトース結合性レクチンを固定化した細胞用基材上には、表面にガラクトースを表現している成熟T-細胞等を選択的に接着させることができる。

【0044】このような細胞用基材にあっては、例えば、吸着させる糖鎖高分子の濃度や組成を変えることによって、固定化するレクチンの密度を容易に調整することができる。また、レクチンは基材表面に濃縮され、その活性サイトが集中しているため、例えば細胞を効果的に凝集させたり活性化したりすることができる。

#### 【0045】

##### 【実施例】

(実施例1) 上記式(1)に示す糖鎖高分子(PV-LA)を合成し、それに黄色蛍光色素であるフルオレセインイソチオシアネート(FITCと略記)を導入した。即ち、3滴のピリジンを添加した5mlの乾燥ジメチルスルホキシドに500mgのPV-LA( $10 \times 10^{-3}$ モルのモノマーユニットに対応する)を溶解した。その溶液に50mgのFITC(和光純薬工業製)を加え、さらに15mgのジブチルスズジラウレートを加えた後、90℃で2時間加熱した。得られた反応混合液からエタノール中で数回再結晶させて濾過することにより、FITC標識PV-LAを得た。

【0046】上記FITC標識PV-LAを100 $\mu$ g/ml含む水溶液を作製し、その水溶液中に直径0.6 $\mu$ mのポリスチレン製ビーズラテックス(Polybead、ポリサイエンス社製)を加え、室温で2時間処理して、ポリスチレン製ビーズにFITC標識PV-LAを吸着させた。次に、上記液にガラクトース認識性レクチンであるSBA(1mg/ml)を添加して室温で保存し、PV-LAのガラクトース残基にSBAを結合させてSBA修飾ビーズとした。

【0047】上記の液を、蒸留水を加えて1500rpmで10分間遠心して上清を取り除く操作により洗浄し、100ng/mlのSBA修飾ビーズを含む液を作製した。別に調整したヒトの末梢血単核球(PBMC)

懸濁液( $1 \times 10^6$ 細胞)に、SBA修飾ビーズ液50 $\mu$ lを添加し、冷暗所で30分間インキュベーションした。さらに、PBSを加えて1500rpmで10分間遠心して上清を取り除く操作により洗浄した後、赤色蛍光物質であるピコエリスリン(PE)を導入した抗CD3抗体を添加し、CD3細胞をPE標識して試料とした。

【0048】比較のため、PV-LAの代わりにPV-MAを吸着させたビーズ、またはPV-LAを吸着させた後にSBAを添加しなかったビーズを用いた以外は上記と同様の処理を施して比較用の試料を用意した。各試料の蛍光強度を、フローサイトメーター(FACScan、ベクトン・ディッキンソン・イムノサイトメトリー・システム社製)で測定した。結果を図3に示す。

【0049】図3において、(A)はPV-LAで処理した後、SBAを添加しなかったビーズで処理した細胞試料、(B)は本発明に従ってPV-LA及びSBAを固定化したビーズで処理した細胞試料、(C)はPV-MAとSBAで処理したビーズで処理した細胞試料から得られた結果である。縦軸は、抗CD3抗体に導入した蛍光物質(PE)に基づく赤色蛍光強度を示し、横軸は、PV-LAまたはPV-MAに導入した蛍光物質(FITC)に基づく黄色蛍光強度である。

【0050】各細胞試料ともPEに基づく蛍光強度は強く、即ちこれらの細胞がT細胞のCD3細胞であることが確認される。しかし、FITCに基づく蛍光強度は、PV-LA及びSBAで処理した細胞試料では強いが、PV-LAのみ、あるいはPV-MA及びSBAで処理した細胞試料ではほとんど観測されなかった。

【0051】成熟したT細胞は、その表面にガラクトースを表現していることが知られている。図2に示すように、本発明の固定化法によって、ビーズ60にPV-LAを介してSBA30を固定化させたSBA修飾ビーズは、SBAのガラクトース認識性によってCD3細胞50の表面に存在するガラクトース残基25に特異的に結合する。従って、このような細胞試料では、抗CD3抗体51に導入したPE及びPV-LAに導入したFITCの両方に基づく蛍光が観察されることが証明された。

【0052】一方、PV-LAを吸着させたのみでSBAを欠くビーズ(図3(A))、及びグルコース残基を有するPV-MAを吸着させ、よってSBAが固定化されていないビーズ(図3(C))は、CD3細胞に結合せず、FITCに基づく蛍光が観察されなかったものと考えられる。言い換えれば、本発明に従ってレクチンを固定化した蛍光性ビーズは、表面にガラクトースを表現している細胞に対し、そのガラクトースに特異的に結合する標識剤として利用できることが示唆されている。

【0053】(実施例2) ポリスチレン製キュベットに、糖鎖高分子であるPV-LA及びPV-MAを各々1.0mg/mlまでの種々の濃度で含む水溶液を一定

量注入し、室温で2時間放置することによりキュベット表面に糖鎖高分子を吸着させた。洗浄後、FITC標識したガラクトース認識性レクチンであるPNAの水溶液(0.1%のBSA、及びPBSを含む)を、各キュベットに同量注入した。

【0054】2時間経過後に洗浄し、20mMのガラクトース及び5mMのEDTAを含むPBSを添加して30分間放置した。その後、キュベット表面から脱離したPNA量を蛍光光度計で測定し、固定化されたPNA量を見積もった。結果を図4に示す。横軸は、糖鎖高分子吸着時の糖鎖高分子水溶液濃度を示し、縦軸は、単位面積当たりに固定化されたPNA量を示す。

【0055】同じくガラクトース認識性レクチンであるECLを用い、上記と同様にしてキュベット表面に固定化されたECL量を見積もった。結果を図5に示す。図4及び図5から明らかなように、ガラクトース認識性レクチンであるPNA及びECLは、ガラクトース残基を有するPV-LAを吸着させたキュベットに優先的に固定化される。さらに、PV-LA吸着量が多くなるにしたがい、固定化されるレクチンの量も増加する。\*

糖鎖高分子 PV-LA:PV-MA	ナチュラル・キラー細胞 接着率 (%)	T細胞 接着率 (%)
未被覆	19.2	33.7
1:1	0.0	42.3
1:0	3.7	43.1

【0059】以上の結果から、PV-LAを介してECLを固定化したウェルには、表面にガラクトースを表現したT細胞が選択的に接着されることがわかる。即ち、本発明の固定化法に従ってレクチンを固定化された基材は、細胞が選択的に接着する高機能な細胞培養基材として使用できる。さらに、PV-LAとPV-MAとを混合して被覆したものでは、ナチュラル・キラー細胞の接着が完全に阻害されており、本発明の固定化法を用いた細胞培養基材が、細胞の接着性を高度にコントロールできる可能性が示唆されている。

【0060】(実施例3)直径3.5mmのポリスチレン製シャーレに、PV-LAを100 $\mu$ g/ml含む水溶液を加え、室温で2時間処理してPV-LAを吸着させた。次に、ガラクトース認識性レクチンであるA110A(20 $\mu$ g/ml)1.5mlを添加して室温で2時間保存した後洗浄し、本発明によるA110Aの固定化を行った。

【0061】比較のため、同様のポリスチレン製シャーレに、A110A(20 $\mu$ g/ml)1.5mlを添加して室温で2時間保存した後洗浄し、従来法によるA110Aの固定化を行った。さらに、未被覆のポリスチレン製シャーレ、及びPV-LAのみを吸着させ、A110Aで処理しなかったシャーレも用意した。

【0062】各シャーレに、200 $\times$ 10<sup>4</sup>細胞のヒト赤血球(RBC)を懸濁したPBS(0.2%BSAを含

\*【0056】次に、12穴マルチウェル(住友ベークライト社製)に、0.2mg/mlのPV-LA水溶液を注入して室温で2時間放置することにより、各ウェルにPV-LAを吸着させた後、100ng/mlのECL水溶液で処理した。それらのウェルに、50、100、及び200 $\times$ 10<sup>4</sup>細胞/mlのPBMC懸濁液(10%のウシ胎児血清(FCS)を含むRPMI1640中)を各々1mlずつ添加し、37℃で30分間インキュベーションした。洗浄後、蛍光標識した抗体で処理し、細胞の接着率を算出した。標識剤としては、FITC標識抗CD16抗体、及びPE標識抗CD3抗体を用いた。

【0057】同様に0.1mg/mlのPV-LA及び0.1mg/mlのPV-MAの混合水溶液から吸着させたウェル、及び未被覆のウェルにおけるPBMCの接着率を測定した。結果を表1に示す。但し、CD16はナチュラル・キラー細胞、CD3はT細胞である。

【0058】

【表1】

む)を1.5mlずつ添加し、37℃で60分間インキュベーションした。その後、非接着RBC数をコーンターカウンターで計数し、RBCの接着率を算出した。ここで、接着率は下式に従って計算し、結果を表2に示す。接着率(%) = {(播き込み数(200 $\times$ 10<sup>4</sup>) - 非接着細胞数) / 播き込み数}  $\times$  100

【0063】

【表2】

シャーレ	接着率 (%)
未被覆	24.3 $\pm$ 1.7
PV-LAのみ	25.7 $\pm$ 2.6
A110Aのみ	19.3 $\pm$ 1.5
PV-LA+A110A	98.7 $\pm$ 1.5

【0064】糖鎖高分子(PV-LA)を介してレクチン(A110A)を固定化したシャーレ上には、まき込んだ細胞のほとんど全部が接着したが、シャーレ表面にA110Aを吸着させただけのシャーレでは、A110Aを固定化していないシャーレと同程度の接着率しか得られなかった。即ち、本発明の固定化法で固定化したレクチンは、従来法に比較して強固に固定化することが可能であり、さらにその活性も向上しているものと考えられる。

【0065】

【発明の効果】本発明のレクチン固定化法によれば、吸着性の良好な糖鎖高分子を基材に吸着させ、その糖鎖高



分子の糖鎖にレクチンを結合させるため、極めて安定に、なおかつ強固にレクチンを固定化することができる。また、糖鎖とレクチンとの特異的結合性を利用して固定化するため、例えば複数のレクチンを含む混合溶液からでも、目的とするレクチンを選択的に固定化できる。

【0066】本発明の固定化法に従ってレクチンを固定化した細胞用基材では、固定化、濃縮されたレクチンによって効果的に機能が発揮され、例えば選択的に細胞を凝集させたり活性化させることができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明のレクチンの固定化法を説明するための模式図である。

【図2】 実施例1の細胞の標識法を説明するための図である。

【図3】 実施例1で処理した細胞のフローサイトメリーの結果を示すグラフである。

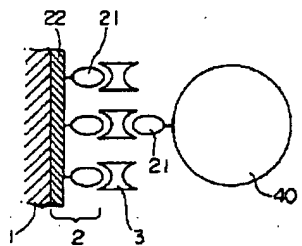
【図4】 糖鎖高分子の吸着量と、それに対するPNA固定化量の関係を示すグラフである。

【図5】 糖鎖高分子の吸着量と、それに対するECL固定化量の関係を示すグラフである。

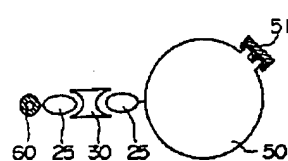
【符号の説明】

1…基材、2…糖鎖高分子、3…レクチン、21…糖鎖、22…高分子主鎖、25…ガラクトース残基、30…SBA、40…細胞、50…CD3細胞、51…抗CD3抗体、60…ポリスチレン製ビーズ。

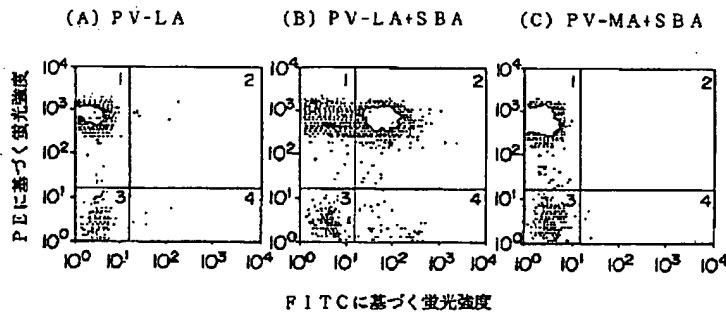
【図1】



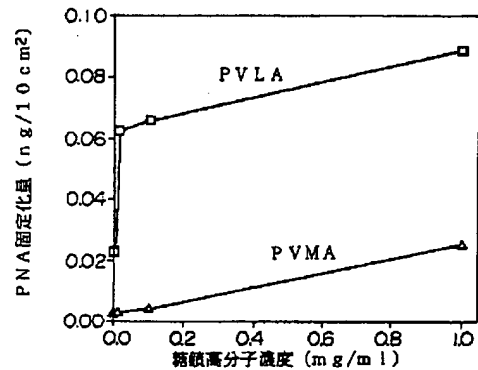
【図2】



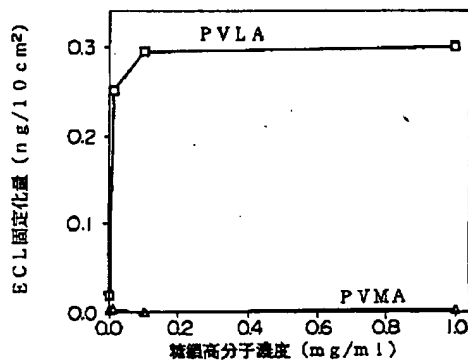
【図3】



【図4】



【図5】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>  
G 0 1 N 33/566

識別記号 庁内整理番号

F I  
G 0 1 N 33/566

技術表示箇所